



CONTEXTE

Les eaux de surface dans les environnements fortement urbanisés, comme la Seine et la Marne en région Parisienne, peuvent contenir un ensemble de pathogènes d'origine fécale ou environnementale. Les contaminations fécales peuvent être d'origine humaine ou animale et peuvent provenir de sources ponctuelles (effluents de stations d'épuration, rejets de déversoirs d'orage et d'ouvrages cadres) ou de sources diffuses (ruissellement sur des surfaces contaminées, resuspension des sédiments, érosion des sols et berges) par temps sec et par temps de pluie. Les rejets de temps de pluie sont notamment à l'origine de fortes dégradations de la qualité des eaux de surface. Les pathogènes peuvent inclure les *E. coli* entérohémorragiques, *Salmonella*, *Shigella*, *Campylobacter*, *Vibrio cholerae*, les virus entériques (Norovirus, Adenovirus, Rotavirus, enterovirus, Hepatitis virus...) et des parasites (*Cryptosporidium*, *Giardia*). Les rongeurs peuvent aussi être porteur de *Leptospirae* et contaminer les eaux de surface. Enfin certaines espèces autochtones des milieux aquatiques peuvent devenir des pathogènes opportunistes (e.g. mycobactéries non-tuberculeuses, *Aeromonas*, *Pseudomonas*, *Plesiomonas*). Par ailleurs certains de ces pathogènes comme *E. coli* ou les *Pseudomonas* peuvent arborer des résistances multiples aux antibiotiques et ainsi exacerber le risque sanitaire.

La variabilité spatiale et temporelle des concentrations en pathogènes et des bactéries résistantes aux antibiotiques reste encore peu connue dans les milieux aquatiques urbains par temps de pluie, malgré l'importance des rejets de temps de pluie dans la gestion des baignades. Ceci tient notamment à la forte variabilité temporelle des événements pluvieux et à la grande diversité des réseaux d'assainissement et des surfaces urbaines ruissellées. L'action 1.1 aura pour but d'apporter des connaissances sur la distribution d'un large éventail d'indicateurs de contamination fécale humains et animaux, de pathogènes bactériens et viraux, et de l'antibiorésistance dans les rejets de temps de pluie afin de mieux caractériser l'origine et d'importance relative des différentes sources de contamination microbiologique des eaux de surface en agglomération parisienne.

OBJECTIFS

L'objectif de l'action 1.1 est de caractériser d'un point de vue microbiologique les sources et flux de contamination microbiologique des eaux des rivières et canaux franciliens afin

- i) d'avoir une meilleure compréhension de la dynamique et de la distribution de différents pathogènes bactériens et viraux dans les rejets de temps de pluie et les eaux de ruissellement
- ii) d'avoir une meilleure compréhension de la dynamique et des résistances aux antibiotiques dans les rejets de temps de pluie et les eaux de ruissellement
- iii) de mieux connaître l'origine des sources de contamination dans les eaux de surface
- iv) d'identifier par modélisation statistique des facteurs physico-chimiques liés la qualité microbiologique des rejets qui pourraient servir de proxy pour le suivi de la qualité des rejets

METHODOLOGIE ET PLANNING

Sites étudiés. Cinq réseaux d'assainissement urbains allant du rejet de station d'épuration au rejet de réseau séparatif pluvial strict seront définis en accord avec le SIAAP, le Conseil Départemental (CD) de la Seine-St-Denis, le CD du Val-de-Marne et la Ville de Paris, de façon à couvrir un continuum de rejets d'origine domestique et pluviale strict ou en mélange. Sur un des réseaux pluviaux dont le bassin versant est bien caractérisé car déjà étudié dans les phases précédentes

d'OPUR, deux types de surfaces imperméables avec et sans circulation d'animaux seront échantillonnés pour évaluer la contribution des animaux à la contamination des rejets pluviaux.

Campagnes de prélèvement. Les rejets seront instrumentés pour réaliser l'échantillonnage en accord avec les partenaires opérationnels. A chaque campagne un échantillonnage représentatif de l'événement pluvieux sera réalisé, ainsi qu'un prélèvement d'eau de surface au droit du rejet.

Protocole analytique.

- *Indicateurs de contamination fécale et sources de contamination* : Les analyses d'indicateurs de contamination fécale (*E. coli*, entérocoques intestinaux, Bactéroidales spécifiques des chiens, des oies et *Catellibacterium marimammaliium*) seront pris en charge par le LEESU. *Escherichia coli* et les entérocoques intestinaux seront analysés selon les normes NF EN ISO 9308-3 et 7899-1, les autres marqueurs seront quantifiés par PCR en temps réel. Afin de caractériser l'origine des sources de contamination par une approche moléculaire de dépistage, l'analyse des communautés bactériennes sera également réalisée par le LEESU. La composition des communautés bactériennes sera examinée par séquençage à haut débit du gène de l'ARNr 16S. Les ADN seront gardés pour constituer une base de référence. Le séquençage sera sous-traité au laboratoire de H. Morrison, (Josephine Bay Paul Center, Marine Biological Laboratory, Woods Hole, USA).

- *Pathogènes* : Les salmonelles, les mycobactéries, *Campylobacter jejuni* et *C. lari* seront analysés par le LEESU. Les leptospires et les virus entériques majeurs (norovirus GI et GII, adénovirus, Rotavirus A) seront analysés par le laboratoire de recherche biologie d'Eau de Paris. Les quantifications seront réalisées par PCR en temps réel.

- *E. coli résistantes aux antibiotiques* : pour chaque échantillon 35 à 50 souches d'*E. coli* résistantes aux antibiotiques seront isolées et la présence d'intégrons sera recherchée. La collection de souche sera stockée à -80°C en cryobilles, ainsi que les ADN, pour constituer des collections de référence géoréférencées.

- Paramètres physico-chimiques : pour chaque échantillon, les paramètres physico-chimiques classiques seront mesurés (pH, conductivité, COD, COP, NH₄). Ces paramètres seront utilisés pour effectuer une analyse statistique des facteurs expliquant la variabilité des concentrations en BIF et pathogènes dans les rejets.

Calendrier.

Pour le temps sec 5 campagnes seront réalisées qui serviront de référence par rapport au temps de pluie. Pour le temps de pluie un nombre plus important de campagnes (6 à 12) sera réalisé pour avoir un ensemble de pluies (>5 mm cumulés) suivant des périodes de temps sec de longueur variable. Les échantillonnages seront réalisés du printemps à l'automne 2019, 2020 et 2021 (en particulier sur les mois de juin à septembre qui correspondent à la période d'ouverture des baignades) en fonctionnement de temps sec.

RESULTATS ATTENDUS ET RETOMBÉES

Les résultats de l'action 1.1 permettront de mieux connaître la contamination véhiculée par les rejets de temps de pluie d'un point de vue quantitatif et qualitatif. Ils permettront également :

- i) de constituer une banque d'échantillons d'ADN, et une collection de souches bactériennes résistantes aux antibiotiques qui seront représentatifs de divers types de réseaux d'assainissement,
- ii) de constituer une banque d'échantillons d'ADN, et une collection de souches bactériennes résistantes aux antibiotiques qui seront représentatifs de divers types de surface ruissellées,
- iii) d'améliorer les méthodes de détection des sources de contamination par comparaison de communautés bactériennes, en implémentant la base de données de séquences représentatives de différentes sources humaines et animales déjà existante au LEESU

iv) de pouvoir mieux hiérarchiser les sources de contamination en Seine, en Marne et au bassin de la Vilette
v) de définir les paramètres microbiologiques et physico-chimiques importants pour le suivi de la qualité microbiologique des eaux urbaines
vi) d'aider à la définition de protocoles d'échantillonnage et de mesure pour le suivi de la qualité microbiologique des eaux urbaines
par ailleurs les données qui seront acquises sur les niveaux de contamination dans les rejets pourront alimenter certains paramètres du modèle hydrodynamique qui sera développé dans l'action 1.2.

CONTACTS

Françoise Lucas, LEESU, Université Paris-Est Créteil (UPEC)
lucas@u-pec.fr